



Universidad
de Cádiz

Facultad de Ciencias

ANÁLISIS MOLECULAR DE CEPAS DE LEVADURA DE VELO DE FLOR EN EL MARCO DE JEREZ



Autor:

Rafael Álvarez Rafael

Tutores:

Francisco Javier Fernández Acero

María Luisa Espinazo Romeu

Grado en Biotecnología

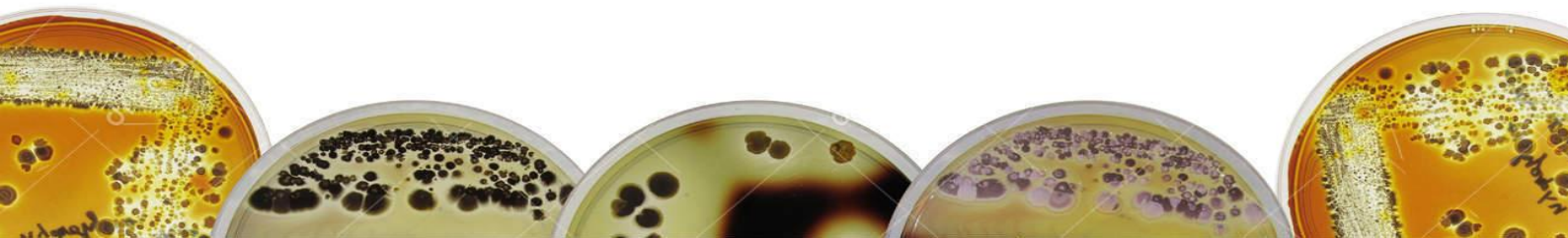
Universidad de Cádiz

Curso 2016 - 2017



Facultad
de Ciencias

Campus de Puerto Real
ciencias.uca.es



ÍNDICE

I. RESUMEN/ABSTRACT	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
1. Antecedentes históricos	3
2. Elaboración de Finos y Manzanillas	4
2.1. Vinos sometidos a crianza biológica	4
2.2. Vinificación en el Marco de Jerez.....	4
2.3. Proceso de crianza biológica.....	5
3. El velo de flor	7
3.1. Formación del velo de flor	7
3.2. Levaduras responsables de la formación del velo de flor	8
4. Caracterización de levaduras	8
4.1. Técnicas clásicas	8
4.2. Polimorfismo cromosómico.....	9
4.3. RFLP de ADN mitocondrial	10
4.4. Citometría de flujo	10
III. OBJETIVOS	11
IV. SOLUCIÓN TÉCNICA Y RESULTADOS.....	12
1. Material y métodos.....	12
1.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo	12
1.2. Reactivos y disoluciones	13
1.3. Electroforesis en campo pulsante (PFGE).....	15
1.4. RFLP de ADN mitocondrial (mtDNA-RFLP)	18
1.5. Citometría de flujo (CMF).....	20
2. Resultados y discusión.....	25
2.1. Polimorfismo cromosómico.....	25
2.2. RFLP de ADN mitocondrial	27
2.3. Determinación del nivel de ploidía	28
3. Perspectivas futuras	31
V. CONCLUSIONES	33
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	34

VII. APÉNDICES.....	36
Apéndice 1. Curvas de crecimiento.....	36
Apéndice 2. Ilustraciones.....	37

I. RESUMEN

Los vinos de Jerez son productos de elevada calidad y reconocimiento internacional en el mundo de la enología. Algunos de ellos, entre los cuales destacan el Fino y la Manzanilla, son sometidos tras la fermentación alcohólica a un bioproceso de envejecimiento conocido como crianza biológica, cuya principal característica es la formación de un biofilm de levaduras en la interfase gas-líquido del vino, denominado *velo de flor*. Esta etapa confiere a los vinos una serie de características organolépticas muy interesantes debidas al metabolismo desarrollado por las levaduras de velo de flor bajo las condiciones de estrés a las que son sometidas.

En el presente estudio se caracterizaron varias cepas de levaduras de velo de flor utilizadas en la crianza biológica de Finos y Manzanillas, usando para ello distintas técnicas de biología molecular como son la electroforesis en campo pulsante (PFGE) y el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (mtDNA-RFLP), ya utilizadas para este fin en otros estudios realizados en la Universidad de Cádiz. Por otro lado destaca la introducción de una técnica novedosa en este ámbito: la citometría de flujo, utilizada de forma habitual en laboratorios de inmunología, pero cuyo uso se extiende cada vez más a otras áreas de conocimiento, y que sirve en este caso para determinar el nivel de ploidía de las células en estudio.

Los resultados obtenidos confirman la utilidad de la citometría de flujo para la determinación del nivel de ploidía de levaduras de crianza biológica, abriendo numerosas posibilidades para esta técnica en el campo de la microbiología. Por otro lado, las técnicas utilizadas no han permitido encontrar diferencias significativas entre las cepas productoras de Finos y Manzanillas.

Palabras clave

Biotecnología, vino de Jerez, velo de flor, caracterización molecular, polimorfismo cromosómico, RFLP, citometría de flujo, nivel de ploidía.

ABSTRACT

Sherry wines are high quality products with international recognition on the oenology world. Between them, Finos and Manzanillas suffer a bioprocess after the alcoholic fermentation known as biological ageing, which main characteristic is the formation of a yeast biofilm in the gas-liquid wine interface, named *flor velum*. This stage confers wines very interesting organoleptic characteristics, due to the metabolism of flor yeast under the stress conditions to which they are submitted.

In the present study several strains of flor yeast used on biological ageing of Finos and Manzanillas were characterized using different molecular biology techniques such as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism (mtDNA-RFLP), already used for this purpose in other studies carried out at the University of Cadiz. On the other hand, the introduction of a new technique in this field stands out: flow cytometry, normally used at immunology laboratories, but whose use extends more and more to other areas of knowledge, and which allows in this case determining the ploidy level of the cells under study.

The results confirm the usefulness of flow cytometry for the determination of the ploidy level of biological ageing yeast, creating new possibilities for this technique in the microbiology field. On the other hand, the techniques used did not allow to find significant differences between Finos and Manzanillas strains.

Keywords

Biotechnology, Sherry wines, flor velum, molecular characterization, chromosomal polymorphism, RFLP, flow cytometry, ploidy level.

II. INTRODUCCIÓN

La biotecnología se define como *la aplicación tecnológica de sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para un uso específico* (CBD, 1992). Basándose en esta definición el vino se puede considerar uno de los productos biotecnológicos más antiguos que se conocen, ya que para su obtención se utilizan sistemas biológicos como son la vid y una compleja combinación de microorganismos.

1. Antecedentes históricos

Las evidencias más antiguas de la elaboración de vino datan del 5400-5000 a.C. (McGovern, 1996) y ya en el 5000 a.C. era producido de forma regular por egipcios y fenicios. En cuanto al origen de la vinificación en España, muchos autores consideran que la vid fue introducida en la zona por el mismo pueblo que fundó el puerto de *Gades* (hoy Cádiz), los fenicios, allá por el 1100 a.C (Mesa, 2000). Tras la ocupación de la zona por los romanos en el año 138 a.C. el comercio en la zona se fue intensificando, pero no fue hasta el 1264 durante la conquista de Alfonso X el Sabio cuando tuvo lugar el primer gran impulso para la producción de vino en la zona de Jerez (Espinazo, 2008). Desde este momento los vinos de Jerez comienzan a ser demandados con mayor intensidad por comerciantes ingleses, franceses y flamencos, promulgándose en 1483 el primer Reglamento de la Denominación de Origen de estos vinos por el cabildo de la ciudad. Sin embargo los vinos elaborados en la región a finales del siglo XVIII eran muy distintos a los producidos en nuestros días, ya que no sufrían ningún tipo de envejecimiento, siendo esta su principal característica en la actualidad.

Ya a mediados del siglo XIX Louis Pasteur y otros investigadores revelaron las primeras evidencias de actividad microbiana durante la fermentación vínica, observando que las levaduras desempeñaban un papel fundamental en la transformación del mosto en vino, y sobre el 1930 se llevaron a cabo los primeros estudios de genética de levaduras (Rodríguez, 2007). Desde entonces y hasta nuestros días cada vez es mayor el dominio que el ser humano tiene sobre este proceso que es la vinificación, en gran parte gracias a los numerosos avances en las áreas de bioquímica, genética y microbiología.

2. Elaboración de Finos y Manzanillas

2.1. Vinos sometidos a crianza biológica

Los vinos de Jerez son producidos en una región situada al noroeste de la provincia de Cádiz conocida como Marco de Jerez, delimitada tradicionalmente por las ciudades de Sanlúcar de Barrameda, Jerez de la Frontera y El Puerto de Santa María, pero que incluye además los términos municipales de Puerto Real, Chiclana de la Frontera, Trebujena, Chipiona, Rota y Lebrija. En esta zona se producen, entre otros, los vinos protegidos por las Denominaciones de Origen *Jerez-Xérès-Sherry* y *Manzanilla - Sanlúcar de Barrameda*, que gozan de gran importancia y reconocimiento internacional en el mundo de la enología (BOJA nº 155 del 8 de agosto de 2013). Dentro de estos vinos algunos como el Fino y la Manzanilla son sometidos a un bioproceso de envejecimiento denominado *crianza biológica*, descrito con más detalle en apartados posteriores.

Aunque el Fino y la Manzanilla son dos de los ejemplos más conocidos de vinos sometidos a crianza biológica no son los únicos, destacando dentro de España las Denominaciones de Origen Montilla-Moriles en Córdoba y Rueda en Valladolid (Mesa, 2000). Esta práctica se da además en otras zonas de Europa como Hungría (Tokaj-Hegyalja), Italia (Sardinia) y Francia (Jura), dando como resultado los vinos *Szamorodni*, *Vernaccia di Oristano* y *Vin Jaune* respectivamente (Legras, 2016). Además, bodegas de otros países con las condiciones ambientales adecuadas se han interesado en la crianza con velo de flor, entre ellos Australia, Sudáfrica y Estados Unidos.

2.2. Vinificación en el Marco de Jerez

La vinificación es un proceso de una gran complejidad, lo cual se evidencia en el amplio número de publicaciones científicas sobre procesos relacionados con la misma y en la existencia de un gran número de profesionales dedicados a su estudio. Desde la siembra de la vid hasta la comercialización del producto se suceden una serie de etapas, cuya conjunción y armonía determinan la calidad final del vino. Este trabajo se centra en la elaboración de los vinos de Jerez, concretamente en la del Fino y la Manzanilla. Ambos son vinos generosos procedentes de mostos de la variedad de uva palomino.

Tras la vendimia se realizan el despalillado (opcional) y la molturación, cuyo objetivo es facilitar la posterior extracción del mosto por el efecto de la presión. Se obtienen diferentes fracciones de mosto en función de la presión aplicada, siendo el

mosto denominado “primera yema” el que se destina normalmente a vinos de crianza biológica, obtenido por presiones inferiores a 2 kg/cm². Los mostos son acondicionados para la fermentación posterior, siendo sometidos a filtración, corrección del pH y adición de anhídrido sulfuroso, con el objeto de prevenir oxidaciones y contaminaciones bacterianas (www.sherry.wine).

Posteriormente se realiza la fermentación alcohólica, en la cual el proceso metabólico más destacable es la transformación de azúcares fermentables como la glucosa y la fructosa en etanol y dióxido de carbono, por parte de ciertas levaduras. Esta etapa suele llevarse a cabo en biorreactores de acero inoxidable de 50.000 litros, sometidos a un control de temperatura, que oscila entre los 23 y los 25°C. Después de la fermentación se obtiene lo que se conoce como *vino base*, que se somete al deslío o clarificación, operación en la cual se separa el vino claro de las lías acumuladas en el fondo del depósito. En este punto se consigue un vino blanco con una graduación alcohólica de entre 11 y 12,5 °.

Los mostos fermentados se someten a un proceso de selección, mediante el cual se determina si su destino es la producción de Fino o Manzanilla (crianza biológica), Amontillado (crianza biológica seguida de crianza oxidativa) u Oloroso (crianza oxidativa únicamente) (Carrascosa, Muñoz, & González, 2011). Aquellos destinados a envejecimiento biológico son encabezados con alcohol hasta un 15 – 15,5% y transferidos a barricas de madera (tradicionalmente denominadas botas) que son llenadas con 5/6 partes de su capacidad (BOJA nº 155 del 8 de agosto de 2013). La adición de alcohol hace que el vino esté mucho más protegido frente a contaminaciones, además de propiciar el desarrollo del velo de flor. La protección natural de este biofilm de levaduras evita la oxidación del vino y le confiere características organolépticas muy especiales (Mesa, 2000).

2.3. Proceso de crianza biológica

La crianza es la fase determinante en la elaboración de los vinos de Jerez; es la más prolongada en el tiempo y en ella se perfilan las características organolépticas que distinguen los diferentes vinos. En el Marco de Jerez se desarrollan dos tipos de crianza: por un lado la *crianza oxidativa* consiste en la guarda del vino en botas de madera, sometido a una lenta evolución físico-química; por otro lado está la denominada *crianza biológica* bajo *velo de flor*, en la que se centra el presente estudio, durante la cual el vino

evoluciona de una forma más dinámica impulsado por la actividad metabólica de un biofilm de levaduras propias de la zona (www.sherry.wine).

A su vez existen dos sistemas de crianza en función de la realización o no de mezclas de vinos procedentes de distintas vendimias. Por un lado está el *sistema de añadas*, en el que los vinos se conservan haciendo referencia a su año de cosecha, siendo envejecidos por separado sin realizar combinaciones de vinos de añadas diferentes; por otro lado el *sistema de criaderas y solera* conlleva una mezcla de los vinos de diferentes vendimias (BOJA nº 155 del 8 de agosto de 2013).

El sistema de criaderas y solera es el utilizado para la producción de Fino y Manzanilla. En este proceso la escala que contiene el vino de mayor antigüedad (*solera*) es la más cercana al suelo y de ella se extrae el vino para ser comercializado. No se vacía todo el volumen sino una fracción menor a 1/3. El vacío creado se repone con vino de la escala que le precede en vejez, denominada *1ª criadera* (proceso denominado *saca y rocío*, imagen 1), y a su vez el vacío generado en esta es repuesto con vino de la *2ª criadera*. Este proceso se repite hasta llegar a la escala más joven, que es repuesta con vino procedente del sistema de añadas (*sobretablas*). El uso de este sistema proporciona un envejecimiento más dinámico, y por lo tanto un producto más homogéneo con un aroma y sabor uniformes (Mesa, 2000).

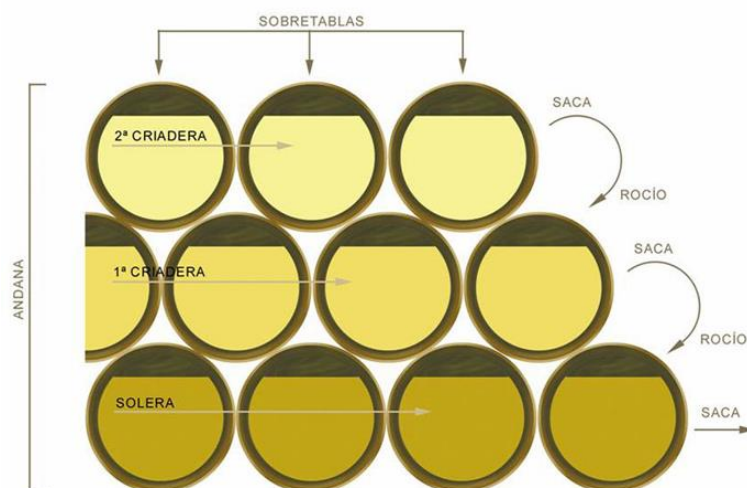


Imagen 1. Descripción gráfica del sistema de criaderas y solera.

El vino en las botas no ocupa todo el volumen sino 5/6 partes del mismo, dejando una cámara de aire necesaria para el desarrollo aerobio de las levaduras de velo de flor (Espinazo, 2008).

3. El velo de flor

3.1. Formación del velo de flor

La crianza biológica, al contrario que la fermentación, constituye un proceso oxidativo (y por lo tanto aerobio) que depende de la actividad metabólica de ciertas cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Las condiciones de falta de nitrógeno y de azúcares fermentables proporcionan un ambiente idóneo para que estas levaduras formen un agregado celular o biofilm, denominado comúnmente *velo de flor*, en la interfase gas-líquido. Entre las causas de la flotación de estas levaduras están un aumento de la hidrofobicidad en su superficie y el atrapamiento de burbujas de CO₂ por parte de los agregados celulares (Legras, 2016).

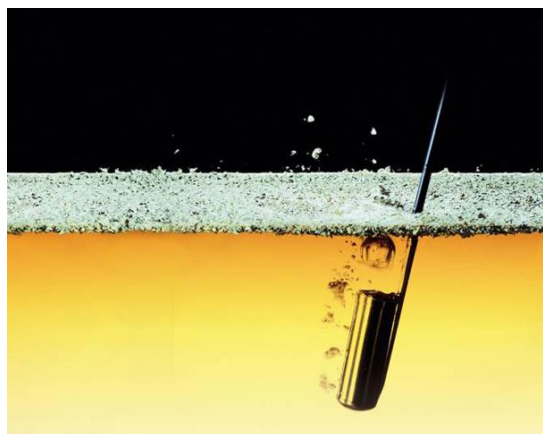


Imagen 2. Velo de flor en la superficie del vino.

La presencia de oxígeno durante la crianza propicia el mantenimiento de este metabolismo oxidativo por parte de las levaduras, lo que tiene como consecuencia importantes cambios en la composición del vino que influyen de manera significativa en las propiedades organolépticas del mismo. Uno de estos cambios es la disminución de la concentración de etanol, que es transformado principalmente en acetaldehído, cuyos derivados aportan a estos vinos peculiares características aromáticas. El acetaldehído puede causar rupturas de doble hebra en el ADN, lo que podría ser la causa del elevado polimorfismo de ADN mitocondrial observado en las levaduras de velo de flor (Hervé, 2013). Otros compuestos consumidos por las levaduras son glicerol, ácido acético, acetato de etilo, varios aminoácidos como la prolina y ácidos orgánicos, produciéndose otros como acetoína y 2,3-butanodiol.

Una vez formado el velo éste mantiene al vino aislado del oxígeno del aire, lo que sumado al consumo de oxígeno por las levaduras evita su oxidación y permite que mantenga su color pálido característico durante todo el envejecimiento (Mesa, 2000).

La capacidad de estas cepas de levadura para adaptarse a los cambios ambientales descritos depende de la activación de rutas metabólicas que inducen la expresión de genes específicos, como es el caso del gen FLO11, cuya expresión es clave para la

formación del biofilm al aumentar el carácter hidrofóbico de la superficie celular. De hecho, varios estudios evidencian que la delección del gen FLO11 impide la formación del biofilm por parte de estas levaduras (Zara, 2005) (Fidalgo, 2011).

3.2. Levaduras responsables de la formación del velo de flor

Las condiciones bajo las que se desarrollan las levaduras de velo de flor permiten la supervivencia de pocos microorganismos. Como consecuencia de ello, más del 95% del velo está compuesto por la especie *Saccharomyces cerevisiae*, al ser la levadura mejor adaptada a sobrevivir bajo estas condiciones (Hervé, 2013). Aun así la presencia de otras levaduras e incluso hongos filamentosos y bacterias es inevitable. Entre las levaduras no-*Saccharomyces* se pueden encontrar en el velo los géneros *Pichia*, *Candida* y *Hansenula* (Ibeas, 1996).

Anteriormente las 4 razas de *Saccharomyces cerevisiae* implicadas en la formación del velo eran conocidas como *S. beticus*, *S. cheresiensis*, *S. montuliensis* y *S. rouxii*, una clasificación basada en la capacidad de las levaduras para fermentar distintos azúcares (Mesa, 1999). Sin embargo en la actualidad *S. beticus* y *S. cheresiensis* son consideradas sinónimos de *S. cerevisiae*; *S. montuliensis* es considerada como *T. delbrueckii*; y *S. rouxii* es considerada como *Zygosaccharomyces rouxii*, de acuerdo con el último estudio taxonómico (Kurtzman, 2011).

4. Caracterización de levaduras

Las industrias que trabajan con bioprocesos desarrollados por microorganismos necesitan disponer de métodos de identificación de los mismos, con el objetivo de tener controlado el proceso y conocer en todo momento cuales son los agentes biológicos presentes en el cultivo. Este es el caso de las bodegas, en las cuales se desea conocer qué microorganismos están presentes tanto en la fermentación como la crianza biológica. En esta sección se describen algunas técnicas importantes de caracterización microbiana.

4.1. Técnicas clásicas

Por un lado las técnicas de microbiología clásica se basan en el estudio de la morfología y la fisiología microbianas, como pueden ser la simple observación en el microscopio o diferentes pruebas de asimilación de fuentes de carbono o nitrógeno. La mayoría de estas técnicas están en desuso debido a que son métodos muy laboriosos e

imprecisos, y al desarrollo de técnicas mucho más precisas, basadas en la biología molecular, y que permiten diferenciar entre microorganismos incluso a nivel de cepa.

4.2. Polimorfismo cromosómico

La electroforesis en gel de agarosa es una de las herramientas más utilizadas en Biología Molecular para el análisis de ácidos nucleicos (Espinazo, 2008). Existe una serie de técnicas denominadas en conjunto *electroforesis en campo pulsante*, o PFGE por sus siglas en inglés (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), en las que la dirección del campo eléctrico aplicado varía en forma de pulsos durante el transcurso de la electroforesis. De esta forma se consigue una dinámica de migración más compleja que aumenta el poder de resolución, permitiendo separar moléculas de gran tamaño e incluso cromosomas completos que se diferencian entre sí en relativamente pocas bases (Rodríguez, 2007).

Se han descrito una serie de sistemas de campo pulsante que difieren entre ellos en la geometría de los electrodos y en el método de reorientación de los campos eléctricos (Mesa, 2000). De todos ellos cabe destacar la *electroforesis en campo eléctrico homogéneo* (CHEF, *Countor-clamped Homogeneous Electric Fields*). Este sistema, utilizado en el presente proyecto, consta de un hexágono con 24 electrodos que rodean al gel y producen un campo eléctrico homogéneo que alterna entre dos direcciones orientadas 120 grados una con respecto a la otra (Rodríguez, 2012). De esta manera es capaz de separar fragmentos de 1 a 6000 kb (Espinazo, 2008), lo que lo hace idóneo para diferenciar entre cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, cuyos cromosomas tienen tamaños de entre 200 y 2500 kb (Ribéreau-Gayon, 2006).

Durante la electroforesis en campo pulsante los cromosomas migran a través del gel de agarosa con una velocidad que depende de su tamaño y su estructura tridimensional, lo que se traduce en la resolución del genoma en bandas cromosómicas, obteniéndose lo que se conoce como *cariotipo electroforético* (Mesa, 2000). Los patrones de cepas distintas pueden presentar diferencias en el número, intensidad y movilidad electroforética de las bandas, permitiendo diferenciar así unas cepas de otras si el cariotipo electroforético es distinto (Rodríguez, 2007).

Para la utilización de estas técnicas se requiere una preparación adecuada de las muestras que implica la liberación de los cromosomas del núcleo de las células previniendo la posible ruptura de los mismos (Rodríguez, 2012).

4.3. RFLP de ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (mtDNA) de *S. cerevisiae* tiene dos características destacables: es extremadamente polimórfico, a nivel de cepa; y es estable, ya que muta muy raramente durante la división vegetativa. Las endonucleasas de restricción son enzimas que cortan el ADN en sitios específicos, denominados dianas de restricción. Este proceso genera numerosos fragmentos de tamaño variable, que en el caso del mtDNA son pocos, y pueden ser separados mediante electroforesis en gel de agarosa (Ribéreau-Gayon, 2006). Diferentes patrones de bandas para digestiones con una misma enzima evidencian el hecho de que se trata de cepas distintas. El uso de esta tecnología se conoce como RFLP, o *polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción*, que si se aplica al ADN mitocondrial se denomina mtDNA-RFLP.

Las dianas de restricción de las enzimas *Alu I*, *Hinf I* y *Rsa I* (las utilizadas en este trabajo) son mucho más frecuentes en el ADN cromosómico que en el mitocondrial, por lo que el primero es escindido en numerosos fragmentos muy pequeños, considerándose todos los fragmentos superiores a 2 kb como ADN mitocondrial (Rodríguez, 2012).

4.4. Citometría de flujo

Las levaduras de velo de flor tienen ploidía variable, hecho que puede ser utilizado para diferenciar entre distintas cepas (Legras, 2014). Entre los diversos métodos utilizados para la estimación del contenido en ADN nuclear la citometría de flujo es un método rápido y preciso, aplicado con frecuencia debido a su fiabilidad (Nowicka, 2016).

La citometría de flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico, basada en hacer pasar una suspensión de células de una en una por delante de un haz de láser. Este incide sobre la célula generando señales que son recogidas por distintos detectores, y que corresponden a diferentes parámetros de la célula. La luz dispersada por la célula con un ángulo de 5 - 10 ° es proporcional al tamaño de la célula (*Forward Scatter* o dispersión frontal). La luz que entra en la célula y es desviada por el núcleo y otras estructuras internas se considera proporcional a la granularidad (*Side Scatter* o dispersión lateral). Por último, las células pueden marcarse con fluorocromos específicos que se unan a determinadas moléculas y que emiten fluorescencia al ser excitados a una determinada longitud de onda, y cuya intensidad es proporcional a la cantidad de dicha molécula. De esta forma puede determinarse, entre otros, el contenido en ADN (Macey, 2007).

III. OBJETIVOS

El objetivo general del presente proyecto es la caracterización molecular de cepas de levadura formadoras de velo de flor utilizadas en la crianza biológica de vinos del Marco de Jerez, tratando de hallar similitudes y diferencias entre aquellas implicadas en la producción de Finos y las responsables de la elaboración de Manzanillas. Los objetivos específicos que se han planteado son:

1. Comparación entre las levaduras de velo de flor implicadas en la crianza biológica de Finos y Manzanillas mediante la utilización las siguientes técnicas:
 - Electroforesis en campo pulsante (PFGE) para la determinación del cariotipo electroforético.
 - Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (mtDNA-RFLP).
 - Citometría de flujo (CMF), para la determinación del nivel de ploidía.
2. Optimización de la citometría de flujo como técnica para la determinación del nivel de ploidía en levaduras de crianza biológica.

IV. SOLUCIÓN TÉCNICA Y RESULTADOS

1. Material y métodos

1.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas de levadura utilizadas en el presente trabajo (*tabla 1*) fueron seleccionadas de la colección microbiológica de la UCA a partir de los datos recopilados en las Tesis Doctorales desarrolladas previamente en el grupo de investigación (Dr. Mesa, 2000 y Dra. Espinazo, 2008). Estas fueron aisladas del velo de flor de barricas de envejecimiento biológico en las bodegas Sandeman (Jerez de la Frontera) y Barbadillo (Sanlúcar de Barrameda) respectivamente. Aquellas implicadas en la producción de vino Fino se denotan con la letra F, y aquellas correspondientes a Manzanilla, con la letra M. La cepa restante, utilizada únicamente para el análisis por citometría de flujo como referencia diploide, fue encargada a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Cepa	Procedencia
F I	Bodegas Sandeman (Jerez de la Frontera.)
F II	
F III	
F IV	
F V	
F VI	
F VII	
F VIII	
F IX	
M IV	Bodegas Barbadillo (Sanlúcar de Barrameda)
M V	
M VI	
M X	
M XVIII	
CECT 1661	CECT

Tabla 1. Cepas de levadura bajo estudio y su procedencia.

La conservación de las cepas se realizó en glicerol al 20%, manteniéndose a una temperatura de -20°C . El crecimiento para los distintos análisis se llevó a cabo en medio YPD sólido (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%, agar 2,5%) o en medio YPD líquido (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%), y en el caso de las placas de medio sólido, se conservaron a 4°C . En cuanto a las condiciones de crecimiento se

utilizó una temperatura de 28 °C, y una agitación de 180 rpm en el caso del cultivo líquido, utilizando el incubador *Max-Q 6000* (Thermo).

Todos los materiales utilizados para el cultivo de las levaduras, así como los medios de cultivo, fueron previamente esterilizados en el autoclave a una temperatura de 120 °C durante 20 minutos, y todo el trabajo con microorganismos previo a su cultivo se realizó en una cabina de seguridad biológica de flujo laminar clase II (*imagen 3*).



Imagen 3. Cabina de bioseguridad de flujo laminar clase II.

1.2. Reactivos y disoluciones

Electroforesis en campo pulsante

- EDTA 50 mM, pH 8.
- Agarosa de bajo punto de fusión (*Low Melt Agarose*, Bio-Rad) al 1% en EDTA 50 mM, pH 8.
- ⚠ Solución LET, utilizada como agente reductor (0,01M Tris-HCl pH 9; 7,5% v/v β -mercaptoetanol; 0,5 M EDTA). Tanto la preparación como el uso de esta solución debe hacerse en campana de extracción y con mascarilla, debido la elevada toxicidad del β -mercaptoetanol y a la presencia de ácido clorhídrico.
- Solución ESP, utilizada para la lisis celular (1% N-lauroilsarcosina; 1 mg/mL proteinasa K; 0,5 M EDTA pH 9).

- Tampón TBE 10X (108 g de tris, 54 g de ácido bórico y 40 mL de EDTA 500 mM pH 8 en 1 L de agua destilada).
- Tampón TBE 0,5X diluido a partir del anterior.
- ⚠ Solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL en TBE 0,5X). El uso de esta disolución se hace en una sala destinada a este fin, con doble guante siempre que se manipula material contaminado con este reactivo. Este material no debe mezclarse en ningún caso con material destinado a otros usos.

Extracción de ADN

- Solución A (2% Triton-X; 1% SDS; 0,1M NaCl; 0,01M Tris pH 8; 1 mM EDTA, todo diluido en agua milliQ).
- Esferas de cristal de 0,425 – 0,6 mm (Sigma).
- ⚠ Ácido nítrico (HNO₃) 65%. Este reactivo debe manejarse en campana extractora.
- ⚠ Fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (proporción 25 : 24 : 1). La preparación de esta mezcla se realiza en campana extractora para evitar la inhalación de cloroformo.
- Tampón TE pH 8 (10 mM tris-HCl; 1mM EDTA).
- Etanol 100%.
- RNasa A, 1 mg/mL (Thermo).
- Acetato de amonio (NH₄OAc) 5M.

mtDNA-RFLP

- Enzimas de restricción *HinfI*, *RsaI* y *AluI* y sus respectivos tampones 10X: *buffer R* para la primera, y *buffer Tango* para las otras dos (ThermoFisher).
- Tampón TBE 1X.
- Agarosa (*Molecular Biology Certified Agarose*, BioRad).
- *gTPbio Bluxy Safe* (ChemBio), utilizado como alternativa al bromuro de etidio, y que sirve además como tampón de carga. Contiene azul de bromofenol, *xylene-cyanol* y *orange G*.

Curva de crecimiento

- Solución de viabilidad (0,01 g de azul de metileno y 2 g de citrato sódico dihidratado en 10 mL de agua destilada). Las células metabólicamente activas, y por lo tanto viables, son capaces de reducir el azul de metileno transformándolo

en su derivado incoloro. Esto permite distinguir las células viables (incolores) de las que no lo son (azul oscuro).

Citometría de flujo

- Etanol 70% v/v, -20 °C.
- PBS (2,7 mM KCl; 1,4 mM KH₂PO₄; 4 mM Na₂HPO₄; 137 mM NaCl).
- RNasa A 10 mg/mL.
- ⚠ Ioduro de propidio 1 mg/mL (Molecular Probes). Debe ser manejado con cuidado debido a su carácter mutagénico.
- Soluciones necesarias para el funcionamiento del citómetro:
 - Attune Shutdown Solution 1X
 - Attune Wash Solution 1X
 - Attune Bleach
 - Attune Focusing Fluid 1X

1.3. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

Obtención de los plugs de agarosa

Para la obtención del cariotipo electroforético se siguió el protocolo descrito por Rodríguez (2007) con algunas modificaciones, realizando todo el proceso por triplicado para cada una de las cepas con el objetivo de aumentar la representatividad de los resultados. Se inoculó cada uno de los aislamientos en 15 mL de medio YPD líquido, incubándose a 28 °C en agitación (180 rpm) durante toda la noche. Posteriormente se recuperó la biomasa mediante centrifugación durante 5 minutos a 3800 rpm y 4°C, desechando el sobrenadante. Cada uno de los precipitados celulares fue resuspendido en 400 µL de EDTA 50 mM, pH 8. De cada una de estas suspensiones se tomaron 300 µL, que fueron mezclados en tubos de 1,5 mL (*Eppendorf*) con otros 300 µL de agarosa de bajo punto de fusión (*Low Melt Agarose*, Bio-Rad) al 0,8% en EDTA 50 mM, pH 8. Tras homogeneizar la mezcla resultante se repartió en moldes de 100 µL, de forma que se obtienen 5 bloques de agarosa (plugs) de cada aislamiento. Los moldes fueron almacenados durante 10 - 15 minutos a 4 °C hasta su solidificación, y transcurrido ese tiempo los plugs fueron extraídos e introducidos en nuevos tubos de 1,5 mL.

Tratamiento de las células

En este punto ya se tienen los plugs de agarosa con las células embebidas y se comienza el tratamiento de las mismas. Para ello se adicionan 500 µL de solución LET a cada tubo, incubándose a 37 °C. Pasadas 24 horas las muestras se lavaron dos veces con EDTA 50 mM, pH 8, con el objetivo de eliminar los restos de LET. Los plugs de cada aislamiento se introdujeron en tubos nuevos de 1,5 mL y se les añadieron 300 µL de solución ESP, incubándose otras 24 horas, esta vez a 50 °C. Transcurrido ese tiempo se volvieron a lavar los plugs, en las mismas condiciones que la primera vez. Finalmente se conservan en solución EDTA 50 mM, pH 8 a 4°C hasta su utilización. La composición de las disoluciones empleadas se detalla en el apartado *reactivos y disoluciones*.

Electroforesis y visualización del resultado

Una vez tratados los plugs, los cromosomas se separaron mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE) utilizando un equipo CHEF DR-II (BioRad) (*imagen 5*). Para ello se utilizaron las condiciones descritas por la Dra. Espinazo en su Tesis Doctoral (2008), que se describen en la *tabla 2*, con una duración total de 22 horas. Los geles empleados se prepararon al 0,8% p/v de agarosa (*Pulsed-Field Certified Agarose*, BioRad) en 80 mL de tampón TBE 0'5X, utilizando el molde que aparece en la *imagen 4*. Los plugs fueron introducidos en los correspondientes pocillos del gel, incluyendo siempre en uno de ellos el marcador de pesos moleculares de *Saccharomyces cerevisiae* YNN295 (BioRad). Una vez preparado el gel con las muestras se introdujo en el equipo junto con 1600 mL del mismo buffer TBE 0'5X.

Tras la finalización de la electroforesis se procede a la visualización del resultado, para lo cual es imprescindible el uso de una tinción específica para el ADN. En ese caso se utilizó bromuro de etidio, un agente mutagénico que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y responde emitiendo una luz anaranjada ante la excitación con luz ultravioleta. Cada uno de los geles fue sumergido durante 10 – 20 minutos en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/mL en TBE 0,5X para ser lavados después con buffer limpio, durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo se introdujo el gel en el transiluminador de luz ultravioleta *Gel Doc XR* (BioRad), y las imágenes se obtuvieron utilizando el programa *Quantity One 1-D Analysis Software*.

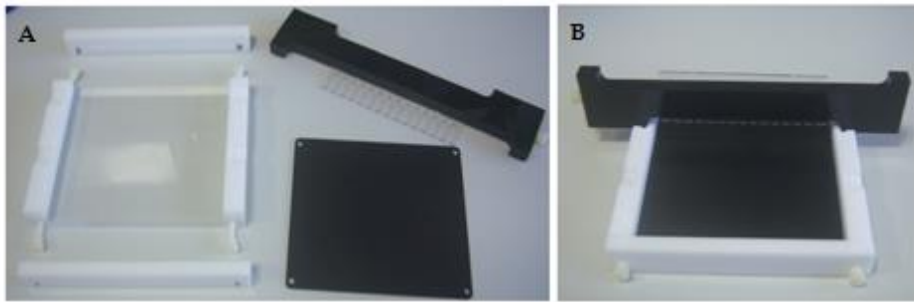


Imagen 4. Molde para el gel de electroforesis en campo pulsante (A) por piezas y (B) una vez montado.



Imagen 5. Sistema CHEF DR-II utilizado para la electroforesis en campo pulsante.

Bloque	I	II
Potencial eléctrico	6.0 V/cm	6.0 V/cm
Pulso inicial	60 s	90 s
Pulso final	60 s	90 s
Tiempo	13 h	9 h
Temperatura del tampón	14 °C	14 °C

Tabla 2. Condiciones usadas para la electroforesis en campo pulsante.

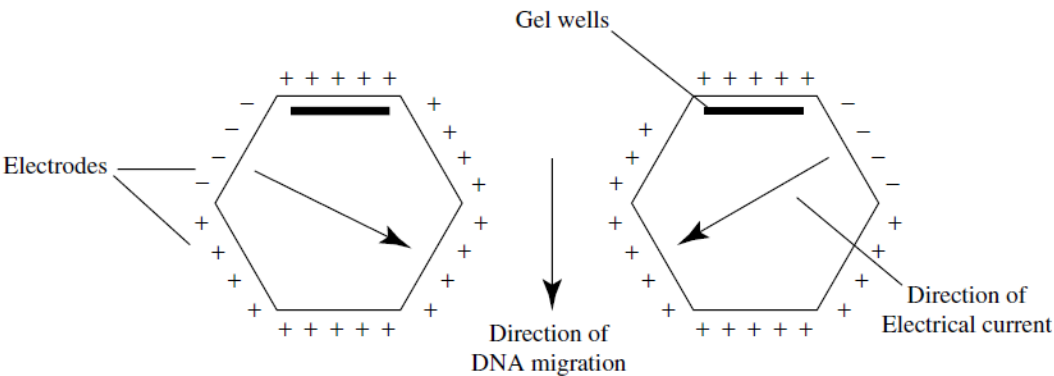


Imagen 6. Funcionamiento del sistema CHEF de electroforesis en campo pulsante

1.4. RFLP de ADN mitocondrial (mtDNA-RFLP)

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por Amberg (2005), y al igual que en el caso de la PFGE, se realizó por triplicado para cada una de las cepas. Las levaduras fueron crecidas en eurotubos estériles con 15 mL de medio YPD líquido, hasta tener una concentración de unas 10^8 células/mL. Los tubos se centrifugan a 3000 rpm 5 minutos, desechando el sobrenadante. Al pellet, que contiene las células, se le añaden 6 mL de agua milliQ, y se divide en alícuotas en tubos *Eppendorf* de 1,5 mL, centrifugándose de nuevo con el objetivo de eliminar los restos de medio de cultivo. Tras desechar el sobrenadante y homogeneizar el pellet se adicionan 200 μ L de la solución A y otros 200 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, además de 0,3 g de esferas de cristal, sometiendo la mezcla a la agitación del vórtex durante 2 minutos. De esta forma se consigue extraer el ADN de las células. Posteriormente se adicionan 200 μ L de tampón TE y se centrifuga la mezcla a 13000 rpm 5 minutos. Se forman dos fases: la inferior, orgánica, contiene el fenol y los componentes insolubles en TE; y la superior, en la que se encuentra el ADN, se transfiere a un tubo nuevo y se adiciona 1 mL de etanol 100%. La mezcla se homogeneiza por inversión y se centrifuga de nuevo 2 minutos, consiguiendo de esta forma precipitar el ADN. En este punto se observa un pellet blanquecino que indica la presencia de ADN.



Imagen 7. Termo-agitador TR 100-G.

Purificación del ADN

En este paso se pretenden eliminar los restos de ARN para que no interfieran en la digestión. Para ello se resuspende el pellet obtenido anteriormente en 400 μ L de tampón TE y se adicionan 30 μ g/mL de RNasa A, incubándose la mezcla durante 1 hora a 37°C para optimizar la acción de esta enzima, en el termo-agitador TR 100-G (*imagen 7*). Tras la incubación se adicionan 18 μ L de acetato de amonio 5 M y 1 mL de etanol 100%, y se almacena a -20°C durante unas horas, precipitando así los ácidos nucleicos. Tras centrifugar y eliminar el sobrenadante se deja secar el pellet, y se le adicionan 20 – 25 μ L de tampón TE, pudiéndose conservar a -20 °C hasta su utilización.

Digestión con enzimas de restricción

Para la digestión se utilizó el protocolo descrito por Rodríguez (2007). Las digestiones fueron simples, es decir, empleando una sola enzima en cada reacción. Se utilizaron las siguientes endonucleasas:

Enzima	Diana de restricción
Alu I	5'...AGCT...3'
Hinf I	5'...GANTC...3'
Rsa I	5'...GTAC...3'

Tabla 3. Endonucleasas empleadas en la reacción de digestión, con sus respectivas dianas de restricción.

El volumen de ADN a emplear en la reacción depende de la concentración de ADN en cada caso, por lo que se procedió primero a su medición en el espectrofotómetro *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific) (*imagen 8*), que permite determinar tanto la concentración de ácidos nucleicos como la pureza de los mismos, en términos de absorbancia. Una vez conocida la concentración de ADN se preparó la reacción de digestión con un volumen total de 20 μL , adicionando los siguientes componentes en el orden que se muestra:

- Agua destilada estéril hasta completar el volumen de reacción.
- 2 μL del buffer de reacción específico para cada enzima, concentrado 10x.
- 1 μL de la enzima de restricción (lo que equivale a 12 unidades enzimáticas en el caso de *Hinf I*, y 10 para *Alu I* y *Rsa I*).
- ADN a digerir, unos 50 μg en total.

Finalmente se decidió adicionar 17 μL (el máximo volumen), dada la baja concentración de ADN obtenida. Por lo tanto no fue necesario adicionar agua ya que el volumen de reacción se completó con la solución de ADN. La mezcla resultante fue incubada durante 3 horas a la temperatura óptima de actividad, en este caso 37 °C.



Imagen 8. Espectrofotómetro NanoDrop 2000c.

Electroforesis y visualización del resultado

Para la visualización del resultado de la digestión se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1% (*Molecular Biology Certified Agarose*, BioRad) en TBE 1X. Se cargó en cada pocillo el volumen total de la digestión, mezclado previamente con 3 μ L de *gTPbio Bluxyo Safe* (ChemBio), la tinción utilizada como alternativa al bromuro de etidio. Como marcador de pesos moleculares se utilizó λ *Hind-III* (imagen 9), que fue cargado en el primer pocillo de cada gel. Las condiciones de la electroforesis fueron 90 V durante 2 - 3 horas, con refrigeración para evitar degradaciones.

Una vez terminada la electroforesis se coloca el gel en un transiluminador de luz ultravioleta para obtener las imágenes, en este caso se utilizó el *Gel Doc XR* con el programa *Quantity One 1-D Analysis Software* (Bio-Rad).

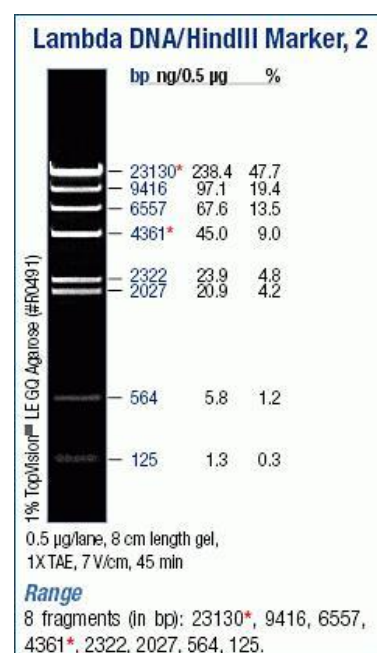


Imagen 9. Marcador de pesos moleculares Lambda Hind-III.

1.5. Citometría de flujo (CMF)

Para la determinación del nivel de ploidía de las cepas en estudio se realizaron varias pruebas como toma de contacto en el citómetro *CyAn ADP* (Beckman Coulter). Los resultados obtenidos fueron muy distantes a lo esperado, con varios picos en los

histogramas que indicaban un gran número de *dobletes* (pares de células que el equipo detecta como un solo evento). Se dedujo que estos dobletes eran debidos a la gemación de las levaduras.

1.5.1. Determinación de curvas de crecimiento

Con el objetivo de reducir el número de dobletes comenzó a realizarse una curva de crecimiento para determinar la duración de las distintas fases de crecimiento en cada una de las cepas, con la intención de fijar las células en fase estacionaria o incluso en fase de muerte, ya que en estas etapas la división celular es mucho menos frecuente y por lo tanto los dobletes serían menos abundantes.

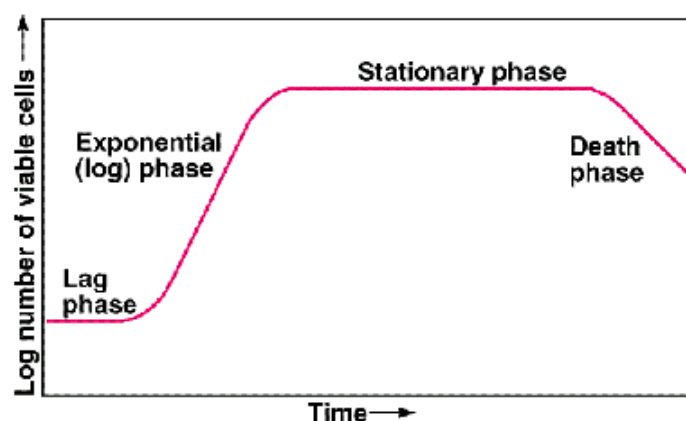


Imagen 10. Curva típica de crecimiento microbiano.

Para ello se inoculó cada una de las cepas en 3 tubos estériles con 15 mL de YPD líquido, incubándose a 28 °C y 180 rpm durante toda la noche. Posteriormente, a partir de estos pre-inóculos se inocularon matraces Erlenmeyer de 100 mL, con 40 mL de YPD líquido, adicionando el volumen necesario de pre-inóculo para obtener una concentración celular inicial de $2 \cdot 10^6$ cél/mL (imagen 11). La concentración celular de los pre-inóculos se determinó usando la cámara de Neubauer.

Una vez inoculados los matraces se realizaron recuentos cada 24 horas en cámara de Neubauer. Los recuentos se llevaron a cabo empleando la *solución de viabilidad* que permite diferenciar las células viables de aquellas que no lo son (ver apartado *reactivos y disoluciones*), mezclando 1 mL de cultivo con 1 mL de solución de viabilidad y dejando la mezcla en agitación suave 10 minutos. Posteriormente se hacen diluciones sucesivas 1:10 con agua destilada y se cuenta la más óptima. Con una serie de cálculos y teniendo en cuenta las diluciones realizadas en cada caso, se llega a la concentración de células viables. Los recuentos se realizaron diariamente hasta observar el comienzo de la fase de

muerte celular. Para la obtención de la curva de crecimiento definitiva se obtuvo la media de los 3 recuentos de cada cepa.

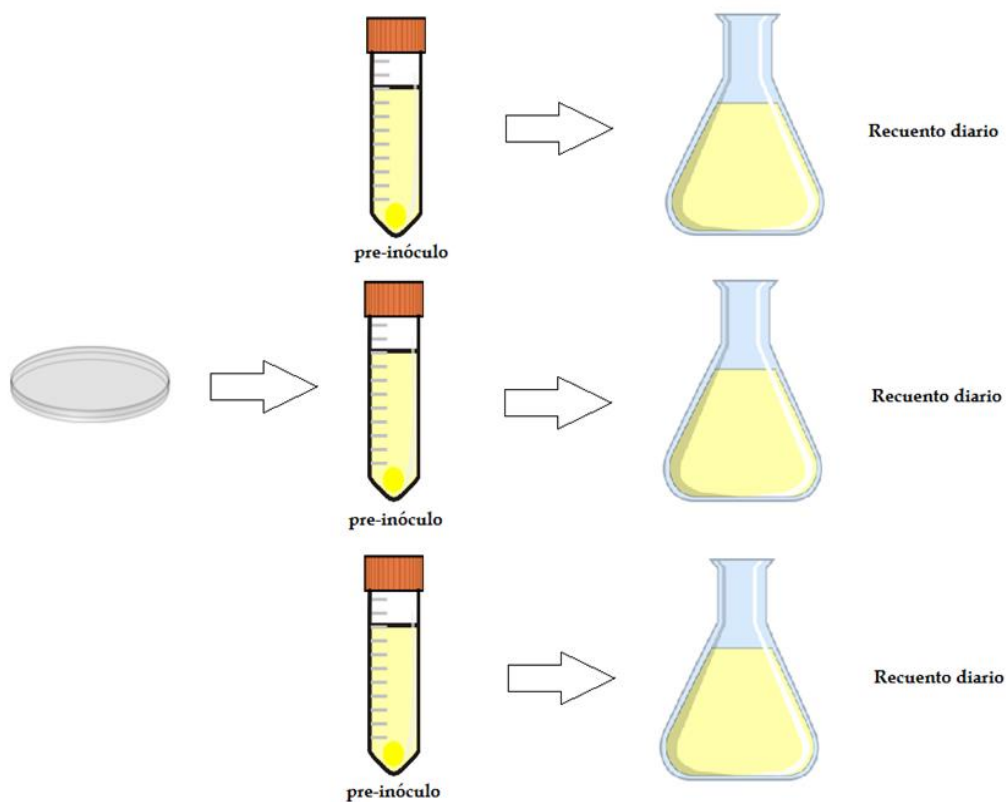


Imagen 11. Esquema del proceso realizado para determinar las curvas de crecimiento de cada cepa.

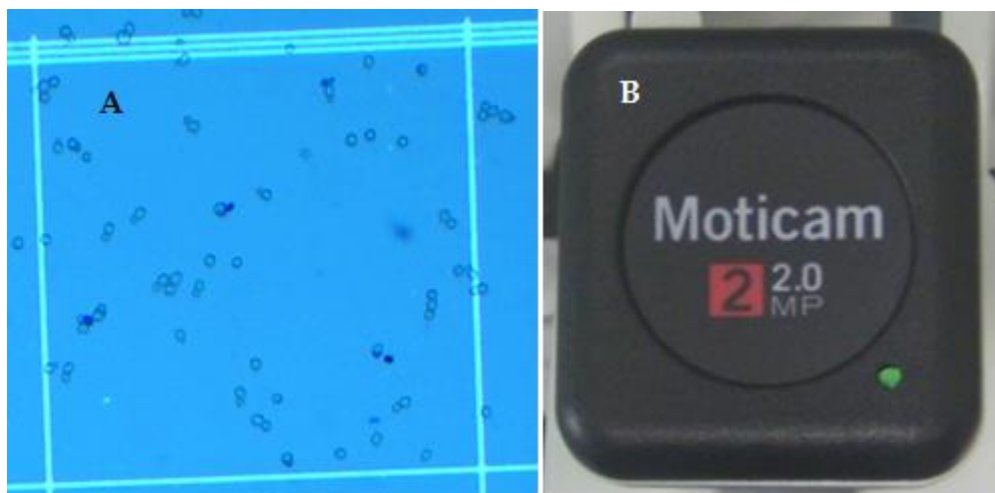


Imagen 12. (A) Fotografía de la cepa F VI en fase exponencial de crecimiento, tomada con la cámara Moticam 2 (B) de Motic acoplada al microscopio. La cuadrícula observada pertenece a la cámara de Neubauer.

1.5.2. Determinación del nivel de ploidía

Fijación de las células con etanol

Para la determinación del nivel de ploidía se siguió un procedimiento basado en el desarrollado por Martínez (1995). En primer lugar se inocularon las distintas cepas en tubos estériles con 15 mL de YPD líquido. Se tomó 1 mL de la suspensión celular entre 10^7 y 10^8 cél/mL, para lo cual se realizaron los respectivos recuentos en cámara de Neubauer. La suspensión celular fue centrifugada a 13.000 rpm durante 1 min, para después desechar el sobrenadante y resuspender el pellet de células en 1 mL de etanol 70%, gota a gota y con agitación constante en el vórtex. Posteriormente se almacenaron las muestras a -20 °C hasta su utilización.

Tinción de las células

Para la determinación del nivel de ploidía es necesaria la tinción del ADN con un fluorocromo adecuado que emita fluorescencia al ser excitado con el láser del citómetro. En este caso se utilizó el ioduro de propidio (IP), un agente mutagénico que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN, y cuyos máximos de excitación y emisión cuando está unido a ADN bicatenario son 535 y 610 nm respectivamente.

Las muestras anteriormente fijadas se sonicaron 2 veces 30 segundos, para después tomar 100 µL de la suspensión celular, centrifugarlas y lavarlas con tampón fosfato salino (PBS) mediante otra centrifugación. Como el ioduro de propidio también se intercala entre las bases del ARN, es necesario eliminarlo. Para ello el pellet celular obtenido se resuspendió en 500 µL de PBS y se añadieron 5 µL de RNasa A (10 mg/mL), incubándose a 37 °C durante 1 hora sin agitación. Tras otro lavado con PBS en la centrífuga el pellet se volvió a resuspender en 500 µL de PBS, y se adicionaron 20 µL de una solución de ioduro de propidio a 1 mg/mL (ThermoFisher), incubando la mezcla durante 30 minutos en oscuridad.

Adquisición de los datos

Una vez realizada la tinción se procedió al análisis de las muestras en el citómetro de flujo *Attune NxT* (imagen 13), que en este caso posee un láser azul. De cada cepa en estudio se analizaron 3 réplicas, adquiriendo un total de 10.000 eventos por cada muestra, a una velocidad de flujo de 100 - 200 µL/min. Se ajustaron los voltajes y se mantuvieron iguales para todos los experimentos realizados.



Imagen 13. Citómetro de flujo Attune NxT (ThermoFisher).

Análisis estadístico y cálculo de la ploidía

Una vez adquiridos los datos de todas las muestras se obtuvieron las gráficas para el análisis estadístico correspondiente, utilizando el software *Attune NxT versión 2.5*. En primer lugar se representa un gráfico de puntos (en este caso un *density plot*, *imagen 14.A*), seleccionando del mismo la población celular, despreciando si es necesario el ruido de fondo y todas aquellas partículas que no sean células mediante un gate. Posteriormente se representa en un histograma la intensidad de fluorescencia frente al número de células (*imagen 14.B*). En el presente trabajo se utilizó el canal BL2 y la anchura de la señal (*width*), además de una escala lineal, ya que esta es la configuración adecuada para los análisis de ADN.

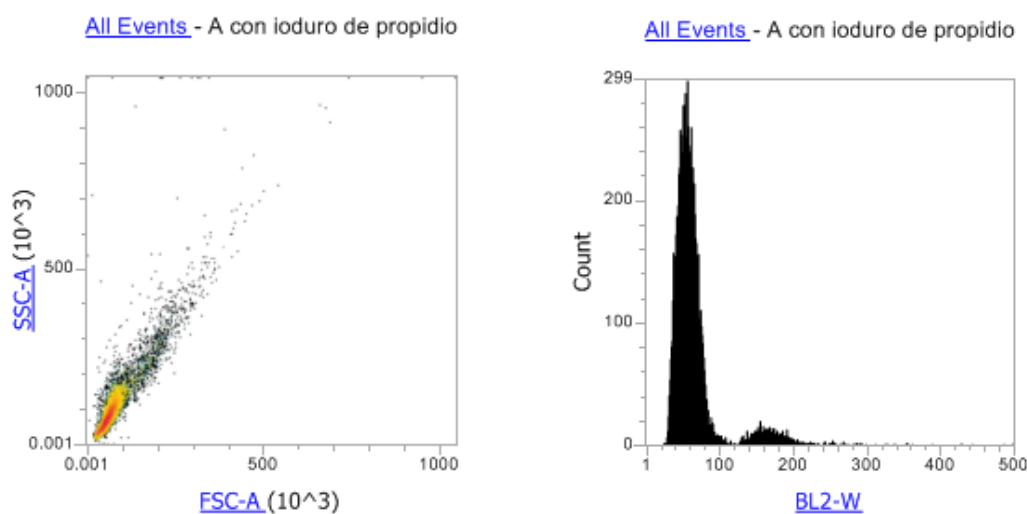


Imagen 14. (A) Gráfico de densidad, (B) histograma de fluorescencia en el canal BL2-width.

El cálculo de los niveles de ploidía se hizo en base al establecido por Greilhuber (2007), para el cual es necesaria una referencia de ploidía conocida, en este caso la cepa diploide de *S. cerevisiae* CECT 1661. Conocido el pico máximo de la intensidad de fluorescencia en cada muestra, el cálculo se realiza de la siguiente forma:

$$\text{Ploidía de la muestra} = \left(\frac{\text{Posición del pico de la muestra}}{\text{Posición del pico de referencia}} \right) \cdot \text{Ploidía de referencia}$$

Como la cepa de referencia es diploide, el cálculo se simplifica a:

$$\text{Ploidía de la muestra} = \left(\frac{\text{Posición del pico de la muestra}}{\text{Posición del pico de referencia}} \right) \cdot 2$$

Para una mayor representatividad el análisis de cada una de las cepas se hizo por duplicado, haciendo la media de ambos resultados.

Los dobletes fueron discriminados utilizando el software *NovoExpress versión 1.2.4* (ACEA Biosciences), representando en un gráfico de puntos la anchura (W) frente al área (A) de la intensidad de fluorescencia. De las dos poblaciones observadas se discrimina la que posee mayor intensidad de fluorescencia, que corresponde a los dobletes. El proceso se muestra en resultados y discusión, en la *imagen 19*.

2. Resultados y discusión

2.1. Polimorfismo cromosómico

Los primeros intentos de electroforesis en campo pulsante no dieron como resultado cariotipos electroforéticos válidos para ninguna de las cepas, por lo que tras varios intentos se decidió introducir cambios en el protocolo seguido inicialmente, propuesto por Rodríguez (2007). El principal problema era la intensidad de las bandas, tan pobre que no permitía la identificación de patrones, como puede apreciarse en los cuatro geles de la *imagen 15*. La migración de las bandas era correcta por lo que no se introdujeron cambios en las condiciones de la electroforesis, sino que se modificó la concentración de agarosa LM en los plugs realizando intentos con concentraciones de 0'8, 1 y 1'2%.

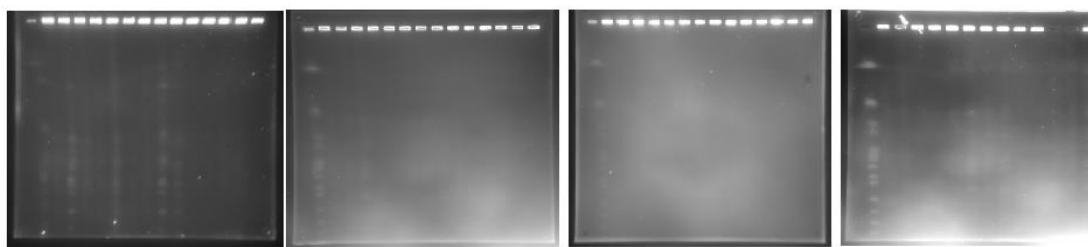


Imagen 15. Primeros intentos de PFGE realizados sin éxito, utilizando una concentración de agarosa en los plugs del 1%.

Finalmente se obtuvieron los cariotipos electroforéticos definitivos (*imagen 16*) utilizando una concentración de agarosa de 0'8% en los plugs, si bien de las cepas FV, FVI y MV no pudieron obtenerse patrones de bandas concluyentes.

En cuanto a la caracterización de las cepas, se observa como las de Fino presentan fundamentalmente dos patrones electroforéticos, denotados como P1 y P2. Las cepas FI, FII, FIII y FIV se ajustan al primer patrón, mientras que el resto se ajusta al segundo de ellos. En el caso de las cepas de Manzanilla los patrones de bandas son más uniformes, presentando aparentemente un único cariotipo: el P3.

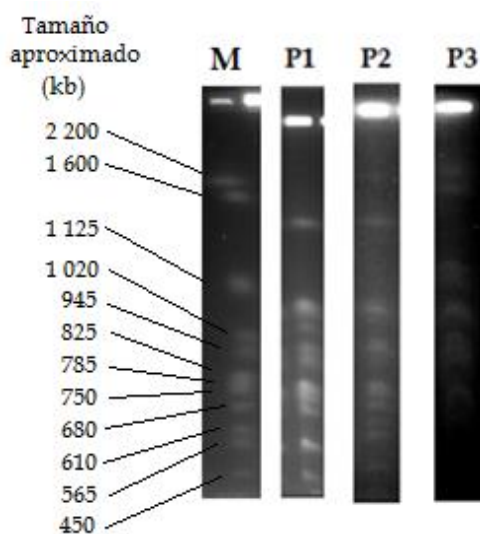


Imagen 16. Marcador de pesos moleculares (M), y patrones de bandas determinados para Fino (P1 y P2) y Manzanilla (P3).

Puede concluirse por lo tanto que la técnica de electroforesis en campo pulsante únicamente ha permitido diferenciar entre 3 tipos de cepas distintas, existiendo dos cariotipos electroforéticos para las cepas de Fino y uno para las de Manzanilla. Destacar que las diferencias observadas entre los distintos patrones de bandas son muy leves, y este hecho sumado a la ausencia de patrones para ciertas cepas haría necesaria la repetición de los análisis para obtener unos resultados más claros.

2.2. RFLP de ADN mitocondrial

El uso de las enzimas de restricción *Alu I*, *Hinf I* y *Rsa I* permite que todos los fragmentos superiores a 2 kb sean considerados como ADN mitocondrial, por lo tanto solo dichos fragmentos son de interés para este análisis. Esto se debe a que, al ser las dianas de restricción para estas enzimas mucho más frecuentes en el ADN genómico que en el mitocondrial, todos los fragmentos generados por el corte de los cromosomas son de un tamaño menor a 2000 pb.

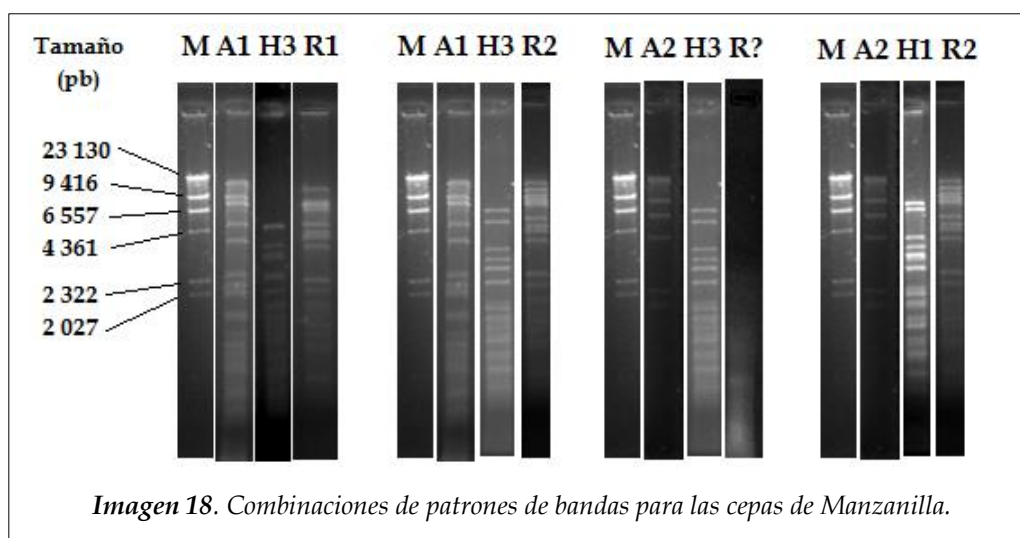
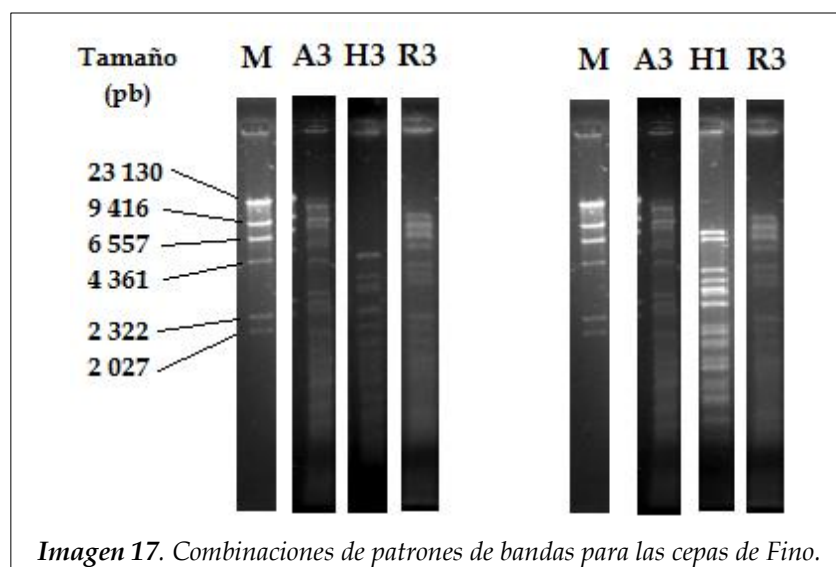
En cuanto los resultados obtenidos, para las cepas de Fino los patrones de bandas en la digestión simple con la enzima *Hinf I* indican que las cepas FI, FII y FIII presentan un mismo patrón, denotado como H1, mientras que el resto muestran el patrón H2 (*imagen 17*). Con las enzimas *Alu I* y *Rsa I* no se encontraron diferencias entre las cepas de Fino, presentando todas las cepas los mismos patrones (A3 y R3).

Por otro lado las cepas de Manzanilla presentan una variabilidad mucho mayor, observándose 4 combinaciones distintas de patrones para las diferentes digestiones realizadas (*imagen 18*), evidenciando un mayor grado de polimorfismo. Nótese que el patrón de bandas para la digestión de la cepa M VI con la enzima *Rsa I* no pudo determinarse. El resumen de los resultados se muestra en la *tabla 4*.

Grupo	Cepas	Perfil de restricción
Fino	FI, FII y FIII	A3-H3-R3
	FIV, FV, FVI, FVII, FVIII y FIX	A3-H1-R3
Manzanilla	MIV y MV	A1-H3-R1
	M VI	A1-H3-R2
	M X	A2-H3
	M XVIII	A2-H1-R2

Tabla 4. Perfiles de restricción obtenidos mediante mtDNA-RFLP.

Dados los resultados que se muestran, puede concluirse que el perfil de restricción de las cepas de Fino presenta una estabilidad mucho mayor que en el caso de las cepas de Manzanilla.



2.3. Determinación del nivel de ploidía

Recurriendo a bibliografía se observó que los dobletes pueden minimizarse (aunque no eliminarse) fijando las células a 36 horas de su inoculación (Legras, 2014), por lo que finalmente se decidió dejar a un lado la cinética de crecimiento y hacerlo de esta forma. Tras el éxito cosechado con este procedimiento la cinética de crecimiento resultó del todo inútil, por lo que las gráficas obtenidas no se muestran en resultados sino en el *apéndice 1*.

En cuanto al cálculo del nivel de ploidía, los picos determinados con la cepa diploide fueron 56 y 53 para las dos réplicas realizadas, por lo que se toma como pico de referencia diploide la media de ambos: 54,5. Con el cálculo detallado en material y métodos se obtuvieron los niveles de ploidía que aparecen en la última columna de la *tabla 5*.

Todos los niveles de ploidía calculados están comprendidos entre 2 y 2,5, unos resultados lógicos teniendo en cuenta el elevado grado de aneuploidía que caracteriza a las levaduras de velo de flor. La ploidía de la cepa M VI fue analizada previamente por Legras (2014), dando el mismo resultado (2.0), confirmando que la ejecución del análisis ha sido correcta.

	Cepa	Pico problema	Pico Diploide	Contenido diploide	Contenido problema	Promedio
F I	A	71	54.5	2	2.6	2.5
	B	66	54.5	2	2.4	
F II	A	69	54.5	2	2.5	2.5
	B	67	54.5	2	2.5	
F III	A	69	54.5	2	2.5	2.5
	B	68	54.5	2	2.5	
F IV	A	67	54.5	2	2.5	2.4
	B	65	54.5	2	2.4	
F V	A	61	54.5	2	2.2	2.3
	B	66	54.5	2	2.4	
F VI	A	55	54.5	2	2.0	2.2
	B	66	54.5	2	2.4	
F VII	A	54	54.5	2	2.0	2.1
	B	62	54.5	2	2.3	
F VIII	A	64	54.5	2	2.3	2.4
	B	68	54.5	2	2.5	
F IX	A	63	54.5	2	2.3	2.3
	B	61	54.5	2	2.2	
M IV	A	61	54.5	2	2.2	2.2
	B	59	54.5	2	2.2	
M V	A	68	54.5	2	2.5	2.5
	B	69	54.5	2	2.5	
M VI	A	51	54.5	2	1.9	2.0
	B	58	54.5	2	2.1	
M X	A	71	54.5	2	2.6	2.5
	B	64	54.5	2	2.3	
M XVIII	A	66	54.5	2	2.4	2.3
	B	62	54.5	2	2.3	

Tabla 5. Cálculo del contenido en ADN de las cepas problema. El promedio de las dos réplicas es el nivel de ploidía calculado para las cepas problema.

Para una visualización más clara de los resultados se muestra en la *imagen 19* un *overlay* (superposición) de dos histogramas distintos en los que se representa la intensidad de fluorescencia. En él se observa la diferencia entre la fluorescencia emitida por la cepa diploide en comparación con la que emite la cepa FI, de ploidía 2,5.

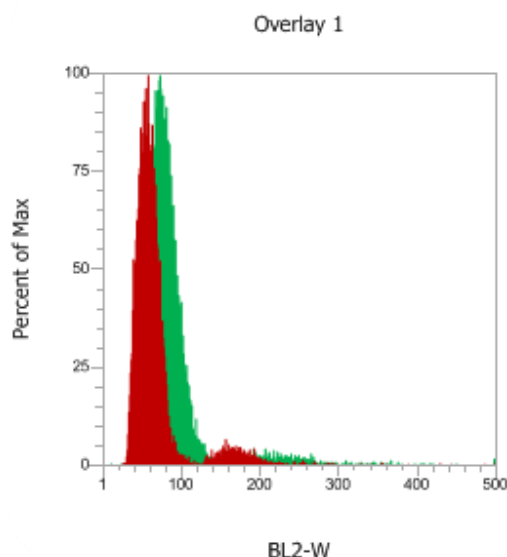


Imagen 19. Overlay de la referencia diploide (izquierda) con la cepa FI (derecha).

Por último, señalar que la discriminación de dobletes es recomendable siempre, aunque en este caso no es necesaria, ya que como se puede apreciar en la *imagen 20.A* el pico correspondiente a los dobletes no llega a ser mayor que el pico de las células simples en ninguna de las muestras, por lo que no modifica el dato que se utiliza para el cálculo de la ploidía.

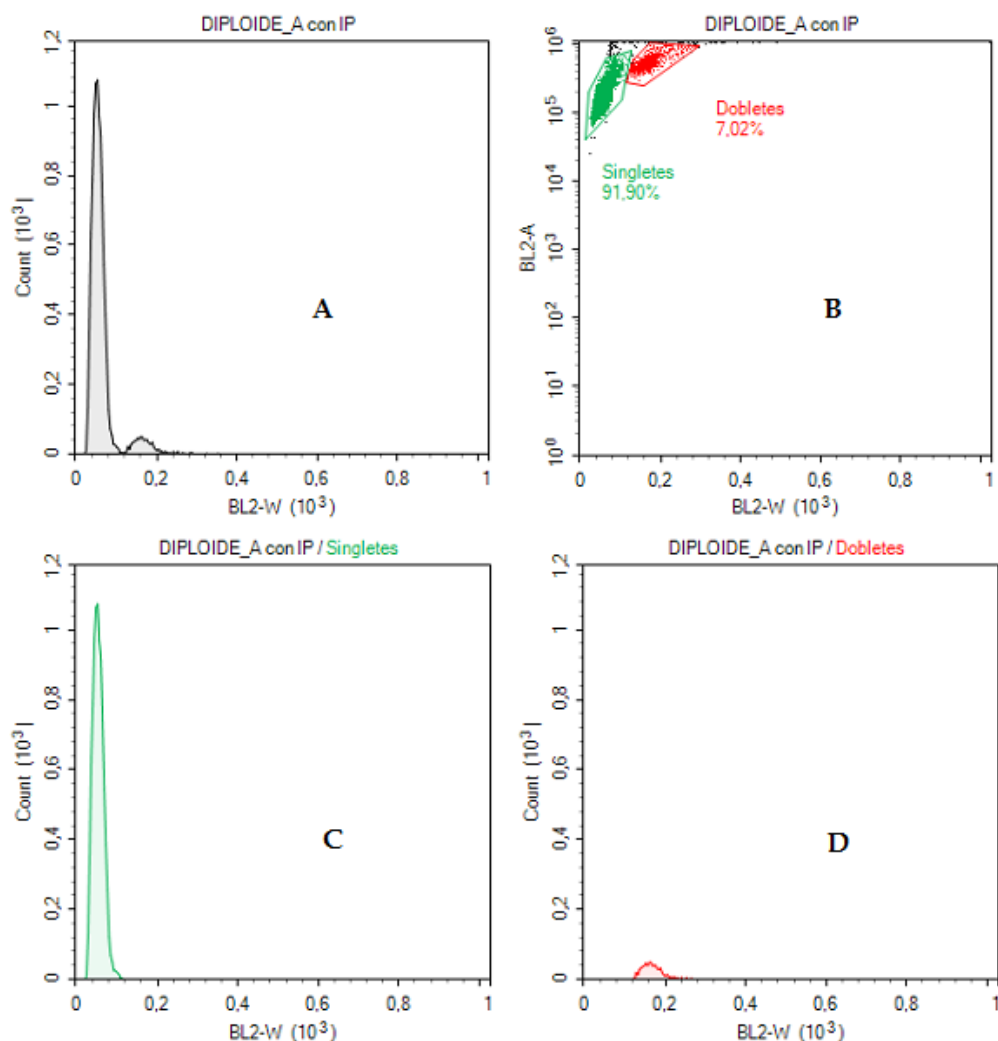


Imagen 20. Discriminación de dobletes. (A) Histograma sin discriminación, con todos los eventos. (B) Gates realizados para discriminar dobletes (rojo). (C) Histograma sólo con las células simples. (D) Histograma sólo con dobletes.

3. Perspectivas futuras

Gracias al presente trabajo la citometría de flujo se incluirá, presumiblemente, entre las técnicas que en la actualidad se llevan a cabo en la Universidad de Cádiz para la caracterización genética de levaduras de vinificación. Se espera que sea una técnica de gran utilidad que permita tanto la determinación del nivel de ploidía de las levaduras como la detección de mutaciones cromosómicas en las mismas, mediante el marcaje del ADN con fluorocromos específicos. De hecho dentro del grupo de investigación al que pertenece este proyecto ya se está trabajando en aumentar las posibilidades que la

citometría de flujo ofrece al área de la microbiología, tanto con levaduras como con microalgas, para futuras investigaciones.

Una de las aplicaciones con mayor potencial para la industria enológica podría ser la detección temprana de microorganismos indeseables en el vino, como es el caso del género de levaduras *Dekkera*. La citometría de flujo permite una identificación mucho más rápida y directa que los métodos tradicionales, y para ello solo es necesario el anticuerpo monoclonal adecuado marcado con un fluorocromo específico.

Por otro lado, se seguirá haciendo hincapié en la búsqueda de diferencias genéticas entre las cepas de velo de flor de Fino y las de Manzanilla.

V. CONCLUSIONES

A la vista de los objetivos planteados y de la discusión realizada sobre los resultados obtenidos, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. El nivel de ploidía de las levaduras de crianza biológica fue determinado con éxito, confirmando la utilidad de la citometría de flujo para este fin.
2. El análisis mediante PFGE permite diferenciar únicamente 3 cariotipos electroforéticos distintos, lo que sumado a la baja intensidad de las bandas hace necesaria la repetición de los experimentos para la obtención de unos resultados más claros.
3. La caracterización genética mediante mtDNA-RFLP evidencia que las cepas de Fino son más estables en cuanto al perfil de restricción, siendo los perfiles de las cepas de Manzanilla mucho más variables.
4. No se han encontrado diferencias significativas entre las cepas implicadas en la producción de Fino y las de Manzanilla, siendo este el objetivo de investigaciones futuras.

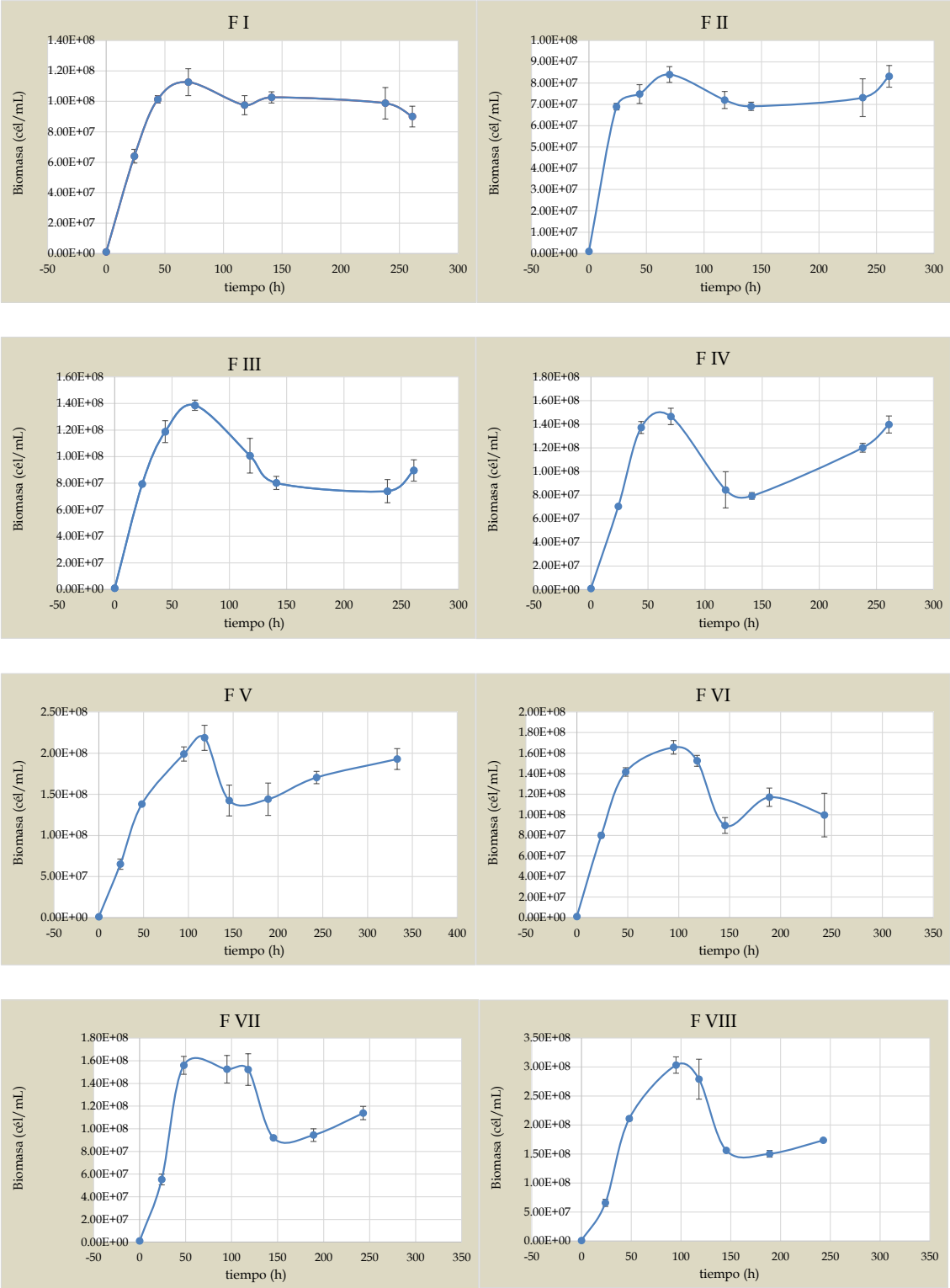
VI. BIBLIOGRAFÍA

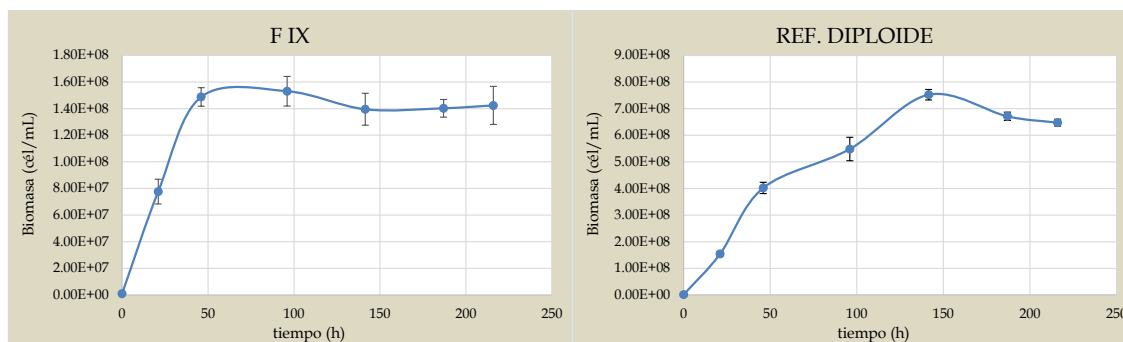
- Amberg, D. C. (2005). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Carrascosa, A. V., Muñoz, R., & González, R. (2011). *Molecular Wine Microbiology*. Elsevier.
- CBD. (1992). Convention on Biological Diversity.
- Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente. (8 agosto 2013). Orden por la que se aprueba el Reglamento de las Denominaciones de Origen Jerez-Xérès-Sherry» y «Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda», así como sus correspondientes Pliegos de Condiciones. In *Boletín Oficial de la Junta de Andalucía* núm. 155 (pp. 126-145).
- Espinazo, M. L. (2008). *Tesis Doctoral. Estudio de las características genéticas de levaduras de velo de flor responsables de la crianza biológica del vino Fino de Jerez y Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda*. Cádiz.
- Fidalgo, M. B. (2011). Adaptive evolution by mutations in the Flo11 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 11228 - 11233.
- Greilhuber, J. (2007). Nuclear DNA content measurement. In J. Doležel, J. Greilhuber, & J. Suda, *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*. Wiley-VCH.
- Hervé, A. (2013). Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* - Their ecology, genetics and metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 269-275.
- Ibeas, J. I. (1996). Detection of *Dekkera-Brettanomyces* Strains in Sherry by a Nested PCR Method. *Applied and Environmental Microbiology*, 998-1003.
- Kurtzman, C. F. (2011). *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 5th ed. Elsevier.
- Legras, J.-L. (2014). Population Structure and Comparative Genome Hybridization of European Flor Yeast Reveal a Unique Group of *Saccharomyces cerevisiae* Strains with Few Gene Duplications in Their Genome. *PLOS ONE*.
- Legras, J.-L. (2016). Flor Yeast: New Perspectives Beyond Wine Ageing. *Frontiers in Microbiology*.
- Macey, M. G. (2007). *Flow Cytometry - Principles and Applications*. New Jersey: Humana Press.
- Martínez, P., Codón, A., Pérez, L., & Benítez, T. (1995). Physiological and Molecular Characterization of Floe Yeast: Polymorphism of Flor Yeast Populations. *Yeast*, 1399-1411.
- Martínez, P., Perez Rodríguez, L., & Benítez, T. (1997). Factors which Affect Velum Formation by Flor Yeast Isolated from Sherry Wine. *System. Appl. Microbiol.*, 154-157.
- McGovern, P. E. (1996). Neolithic Resinated Wine. *Nature*, 480-481.

- Mesa, J. (1999). Characterization of Yeasts Involved in the Biological Ageing of Sherry Wines. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 114-120.
- Mesa, J. J. (2000). *Tesis Doctoral. Desarrollo de técnicas microbiológicas y moleculares para la selección y caracterización de levaduras y su aplicación en la crianza biológica y propiedades analíticas del vino de Jerez*. Cádiz.
- Nowicka, A. (2016). Nuclear DNA content variation within the genus *Daucus* (Apiaceae) determined by flow cytometry. *Scientia Horticulturae*, 132-138.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications*. Wiley.
- Rodríguez, M. (2009). Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. *Journal of Applied Microbiology*, 1292 - 1302.
- Rodríguez, M. E. (2007). *Tesis Doctoral. Análisis Genómico y Molecular de Levaduras Vínicas. Aplicación a la Mejora del Proceso de Fermentación de Vinos mediante la Selección de Levaduras Autóctonas*. Cádiz.
- Rodríguez, M. E. (2011). Using RFLP-mtDNA for the rapid monitoring of the dominant inoculated yeast strain in industrial wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 331-335.
- Rodríguez, M., Rebordinos, L., Muñoz-Bernal, E., Fernández-Acero, F., & Cantoral, J. (2012). Application of Gel Electrophoresis Techniques to the Study of Wine Yeast and to Improve Winemaking. In S. Magdeldin, *Gel Electrophoresis - Advanced Techniques* (pp. 3-20). Croatia: InTech.
- Sherry Wine. (2017, 02 20). Retrieved from <http://www.sherry.wine/>
- Zara, S. B. (2005). FLO11-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol*, 2934 - 2939.

VII. APÉNDICES

Apéndice 1. Curvas de crecimiento





Apéndice 2. Ilustraciones

Todas las ilustraciones utilizadas a lo largo del documento, tanto las imágenes como las tablas, son de producción propia exceptuando las siguientes:

Imagen 1. Descripción gráfica del sistema de criaderas y soleras. Obtenida de www.sherry.wine

Imagen 2. Velo de flor en la superficie del vino. Obtenida de www.sherry.wine

Imagen 6. Funcionamiento del sistema CHEF de electroforesis en campo pulsante. Obtenida de Ribéreau-Gayon (2006).

Imagen 9. Marcador de pesos moleculares Lambda Hind-III (Thermo). Obtenida de la ficha de descripción del producto.

Imagen 10. Curva típica de crecimiento microbiano. Obtenida de <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm>

Imagen 13. Citómetro de flujo Attune NxT (ThermoFisher). Obtenida de www.thermofisher.com

Imágenes de la portada, obtenidas de <https://www.dreamstime.com> y www.sherry.wine